Notice QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA

Σ **2 x 96**

Test de sang total IFN-γ mesurant les réponses aux antigènes peptidiques ESAT-6 et CFP-10

IVD Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

CE

REF 622120

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALLEMAGNE
Téléphone : +49-2103-29-0

1083163FR Rév. 02

www.QuantiFERON.com

QIAGEN®

Sommaire

Utilisation prévue **4**

Résumé et explication du test **4**

Principes du test 6

Temps requis pour effectuer le test 6

Composants et stockage **7**

Matériel nécessaire (mais non fourni) 8

Stockage et manipulation 8

Avertissements et précautions **9**

Avertissements 9

Précautions 10

Prélèvement et manipulation des échantillons **13**

Instructions d'utilisation **15**

Calculs et interprétation du test **20**

Génération de la courbe de standard 20

Contrôle qualité du test 21

Interprétation des résultats 21

Limitations **23**

Caractéristiques des performances **24**

Études cliniques 24

Caractéristiques des performances du test 29

Informations techniques **34**

Résultats indéterminés 34

Échantillons de plasma coagulé 34

Guide de dépannage **35**

Références **37**

Symboles **42**

Coordonnées **42**

Résumé de la procédure du test **43**

Utilisation prévue

Le test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) est un test de diagnostic *in vitro* utilisant un cocktail peptidique simulant les protéines ESAT-6 et CFP-10 afin de stimuler les cellules dans le sang total héparinisé. La détection de l'interféron-γ (IFN-γ) par le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) est utilisée pour identifier les réponses *in vitro* aux antigènes peptidiques associés à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus est un test indirect de recherche de l'infection par *M. tuberculosis* (y compris de la maladie) destiné à être utilisé en combinaison avec une évaluation des risques, des examens radiographiques ainsi que d'autres évaluations médicales et diagnostiques.

Résumé et explication du test

La tuberculose est une maladie contagieuse provoquée par une infection par les organismes complexes *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) qui se propagent généralement à de nouveaux hôtes via des noyaux de gouttelettes transmis par voie respiratoire par les patients atteints de tuberculose respiratoire. Un individu nouvellement infecté peut tomber malade en l'espace de quelques semaines à quelques mois, mais la plupart des individus infectés restent en bonne santé. L'infection tuberculeuse latente (LTBI), un trouble asymptomatique non contagieux, persiste chez certaines personnes qui peuvent développer une tuberculose quelques mois ou quelques années plus tard. Le principal objectif du diagnostic de la LTBI est d'envisager un traitement médical pour prévenir la tuberculose. Le test cutané tuberculinique (TCT) était jusqu'à récemment la seule méthode disponible de diagnostic de la LTBI. La sensibilité cutanée à la tuberculine se développe de 2 à 10 semaines après l'infection. Toutefois, certains individus infectés ne répondent pas à la tuberculine, notamment ceux souffrant d'une variété de troubles bloquant les fonctions immunitaires, mais aussi d'autres ne souffrant pas de ces problèmes. À l'inverse, certains individus ayant peu de risques de présenter une infection par *M. tuberculosis* montrent une sensibilité à la tuberculine et présentent des résultats positifs au TCT après vaccination par le Bacille Calmette-Guérin (BCG), après une infection par mycobactérie autre que le complexe *M. tuberculosis* ou en raison d'autres facteurs indéterminés.

Il faut distinguer la LTBI de la tuberculose, un trouble à déclaration obligatoire qui affecte généralement les poumons et les voies respiratoires inférieures, mais peut aussi toucher d'autres systèmes organiques. La tuberculose est diagnostiquée à partir de résultats historiques, physiques, radiologiques, histologiques et mycobactériologiques.

QFT-Plus est un test recherchant des réponses immunitaires à médiation cellulaire (CMI) aux antigènes peptidiques qui simulent les protéines mycobactériennes. Ces protéines, ESAT-6 et CFP-10, sont absentes de toutes les souches BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum* (1). Les individus infectés par les organismes complexes MTB présentent généralement des lymphocytes dans leur sang qui reconnaissent ceux-ci ainsi que d'autres antigènes mycobactériens. Ce processus de

reconnaissance implique la génération et la sécrétion de la cytokine IFN-γ. La détection puis la quantification d'IFN-γ constituent la base de ce test.

Les antigènes utilisés dans QFT-Plus forment un cocktail peptidique qui simule les protéines ESAT-6 et CFP-10. De nombreuses études ont démontré que ces antigènes peptidiques stimulaient les réponses IFN-γ dans les cellules T des individus infectés par *M. tuberculosis*. Ce n'est généralement pas le cas chez les individus non infectés ou vaccinés par le BCG ne présentant ni maladie ni risque de LTBI (1-32). Toutefois, les traitements médicaux ou les troubles empêchant la fonction immunitaire peuvent réduire les réponses IFN-γ. Les patients souffrant de certaines autres infections mycobactériennes peuvent aussi répondre à ESAT-6 et CFP-10, car les gènes codant ces protéines sont présents dans *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum* (1, 23). Le test QFT-Plus est à la fois un test de LTBI et un outil utile permettant de diagnostiquer l'infection complexe *M. tuberculosis* chez les patients malades. Un résultat positif étaie le diagnostic de tuberculose, mais des infections par d'autres mycobactéries (p. ex. *M. kansasii*) peuvent aussi entraîner des résultats positifs. D'autres évaluations médicales et diagnostiques sont nécessaires pour confirmer ou exclure la tuberculose.

Le test QFT-Plus présente deux tubes d'antigène TB distincts : Le TB Antigen Tube 1 (TB1) et le TB Antigen Tube 2 (TB2). Les deux tubes contiennent des antigènes peptidiques issus des antigènes associés au complexe MTB, ESAT-6 et CFP-10. Le tube TB1 contient des peptides issus d'ESAT-6 et de CFP-10, conçus pour provoquer des réponses CMI de la part des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$. Le tube TB2, pour sa part, contient un ensemble supplémentaire de peptides ciblés pour l'induction de réponses CMI de la part des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$. Dans le déroulement naturel de l'infection par MTB, les cellules T $CD4^+$ jouent un rôle essentiel dans le contrôle immunologique grâce à la sécrétion de la cytokine IFN-γ. D'après des données probantes récentes, les cellules T $CD8^+$ participent à la défense de l'hôte face à MTB en produisant l'IFN-γ et d'autres facteurs solubles, lesquels activent les macrophages pour stopper la croissance de MTB, détruisent les cellules infectées ou lysent directement le MTB intracellulaire (33-35). Des cellules $CD8^+$ spécifiques à MTB ont été détectées chez des sujets avec la LTBI et avec la TB active, chez lesquels on peut fréquemment trouver les cellules $CD8^+$ produisant l'IFN-γ (36-38). De plus, les lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques à ESAT-6 et CFP-10 semblent être plus fréquemment détectés chez les sujets avec TB active que chez les sujets avec LTBI, et peuvent être associés à une exposition récente à MTB (39-41). En outre, les cellules T $CD8^+$ spécifiques à MTB produisant l'IFN-γ ont également été détectées chez les sujets atteints de la TB active présentant une co-infection au VIH (42, 43) et chez les jeunes enfants atteints de la TB maladie (44).

Principes du test

Le système QFT-Plus emploie des tubes spéciaux de prélèvement sanguin qui sont utilisés pour prélever le sang total. L'incubation du sang est réalisée dans les tubes pendant 16 à 24 heures avant le prélèvement de plasma et la recherche d'IFN-γ produit en réponse aux antigènes peptidiques.

Le test QFT-Plus est effectué en deux étapes. Dans un premier temps, le sang total est prélevé dans chacun des tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus, qui incluent un tube de valeur zéro, un tube TB1, un tube TB2 et un tube mitogène. Le sang peut aussi être prélevé dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium comme anticoagulant avant d'être transféré vers les tubes QFT-Plus.

Le tube mitogène est utilisé avec le test QFT-Plus comme contrôle positif, ce qui peut s'avérer important en cas de doute sur le statut immunitaire de l'individu. Il sert aussi de contrôle pour la bonne manipulation et la bonne incubation du sang.

Les tubes QFT-Plus doivent être incubés à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma est retiré et la quantité d'IFN-γ (UI/ml) est mesurée par ELISA.

Un test QFT-Plus est considéré positif en cas de réponse IFN-γ à l'un des deux tubes d'antigène TB nettement supérieure à la valeur zéro d'IFN-γ en UI/ml. L'échantillon de plasma du tube mitogène sert de contrôle positif IFN-γ pour chaque échantillon testé. Une faible réponse au mitogène (< 0,5 UI/ml) indique un résultat indéterminé lorsqu'un échantillon sanguin présente aussi un résultat négatif aux antigènes TB. Cela peut survenir dans le cas de lymphocytes insuffisants, d'une activité lymphocytaire réduite en raison d'une mauvaise manipulation de l'échantillon, d'un remplissage/mélange incorrect du tube mitogène ou de l'incapacité des lymphocytes du patient à générer l'IFN-γ. Le tube de valeur zéro compense le bruit de fond (par exemple, niveaux excessifs d'IFN-γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles). Le niveau d'IFN-γ du tube de valeur zéro est soustrait du niveau d'IFN-γ pour les tubes d'antigène TB et le tube mitogène.

Temps requis pour effectuer le test

Le temps requis pour effectuer le test QFT-Plus ELISA est estimé ci-dessous ; le temps requis pour tester plusieurs échantillons en lots est aussi indiqué :

Incubation à 37 °C des tubes de sang :	16 à 24 heures
ELISA :	environ 3 heures pour une microplaque ELISA
	(22 individus)
	< 1 heure de travail
	Ajouter 10 à 15 minutes pour chaque microplaque supplémentaire

Composants et stockage

Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin)*		**200 tubes**	**Pack pour patient unique**
N° de référence		**622526**	**622222**
Nombre de tests/pack		**50**	**10**
QuantiFERON Nil Tube (tube de valeur zéro) (bouchon gris, anneau blanc)	Nil	50 tubes	10 tubes
QuantiFERON TB1 Tube (bouchon vert, anneau blanc)	TB1	50 tubes	10 tubes
QuantiFERON TB2 Tube (bouchon jaune, anneau blanc)	TB2	50 tubes	10 tubes
QuantiFERON Mitogen Tube (tube mitogène) (bouchon violet, anneau blanc)	Mitogen	50 tubes	10 tubes
Notice des tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus		1	1

Composants ELISA†	**Kit 2 plaques ELISA**
N° de référence	**622120**
Bandelettes pour microplaques (12 x 8 puits) enduites d'anticorps monoclonaux IFN-γ murins anti-humains	2 jeux de bandelettes pour microplaques 12 x 8 puits
IFN-γ Standard, lyophilized (standard IFN-γ, lyophilisé) (contient de l'IFN-γ humain recombinant, de la caséine bovine, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x flacon (8 UI/ml si reconstitué)
Green Diluent (diluant vert) (contient de la caséine bovine, du sérum normal de souris, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (concentré de conjugué 100x, lyophilisé) (IFN-γ HRP murin anti-humain, contient du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x 0,3 ml (si reconstitué)
Wash Buffer 20x Concentrate (concentré de tampon de lavage 20x) (pH 7,2, contient du ProClin® 300 0,05 % v/v)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solution de substrat enzymatique) (contient du H_2O_2, 3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solution de blocage d'enzyme) (contient 0,5M H_2SO_4)	1 x 15 ml
Notice QFT-Plus ELISA	1

* Toutes les configurations de produits ne sont pas disponibles dans chaque pays. Veuillez vous adresser au service client QIAGEN (coordonnées sur www.qiagen.com) pour de plus amples informations sur les configurations disponibles à la commande.

† Voir page 9 pour les conseils de prudence et les mentions de danger.

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Incubateur à 37 °C ± 1 °C. CO_2 non requis
- Pipettes à volume variable calibrées* de 10 µl à 1 000 µl avec embouts jetables
- Pipettes multicanaux calibrées* de 50 µl et 100 µl avec embouts jetables
- Agitateur de microplaque*
- Eau déionisée ou distillée, 2 litres
- Laveur de microplaque (laveur automatique recommandé)
- Lecteur de microplaques* équipé d'un filtre de 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm

Stockage et manipulation

Tubes de prélèvement sanguin

- Stocker les tubes de prélèvement sanguin entre 4 °C et 25 °C.

Réactifs de kit

- Stocker les réactifs de kit entre 2 °C et 8 °C.
- Toujours protéger la solution de substrat enzymatique de la lumière directe du soleil.

Réactifs reconstitués et inutilisés

Pour obtenir des instructions sur la reconstitution des réactifs, voir la page 16.

- Le standard de kit reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké entre 2 °C et 8 °C.

  Noter la date à laquelle le standard de kit a été reconstitué.
- Une fois reconstitué, le concentré de conjugué 100x inutilisé doit être stocké entre 2 °C et 8 °C et utilisé dans les 3 mois.

  Noter la date à laquelle le conjugué a été reconstitué.
- Le conjugué concentré prêt à l'emploi doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation.
- Le tampon de lavage concentré prêt à l'emploi peut être stocké à température ambiante jusqu'à 2 semaines.

* S'assurer que les instruments ont été vérifiés et calibrés conformément aux recommandations du fabricant.

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Avertissements

- Un résultat QFT-Plus négatif n'exclut pas le risque d'infection par *M. tuberculosis* ou de tuberculose : les résultats faux négatifs peuvent être dus à l'étape de l'infection (p. ex. échantillon obtenu avant le développement de la réponse immunitaire cellulaire), à des troubles comorbides qui affectent les fonctions immunitaires, à une mauvaise manipulation des tubes de prélèvement sanguin après la ponction veineuse, à une mauvaise exécution du test ou à d'autres variables immunologiques.
- Un résultat QFT-Plus positif ne doit pas constituer la base unique ou définitive de la détermination d'une infection par *M. tuberculosis*. Une mauvaise exécution du test peut entraîner des faux positifs.
- Un résultat QFT-Plus positif doit être suivi d'autres évaluations médicales et diagnostiques de la tuberculose active (p. ex. frottis et culture du BAAR, radiographie du thorax).
- Si ESAT-6 et CFP-10 sont absents de toutes les souches BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses connues, il est possible qu'un résultat QFT-Plus positif soit dû à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Si l'on suspecte de telles infections, d'autres tests doivent être effectués.

Précautions

Utilisation prévue uniquement pour le diagnostic *in vitro*

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

AVERTISSEMENT : le sang et le plasma humains doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Observer les directives de manipulation du sang et des produits sanguins en vigueur. Mettre au rebut les échantillons et le matériel en contact avec le sang ou les produits sanguins conformément aux réglementations nationales, régionales et locales en vigueur.

Les mentions de danger et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants du QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Mentions de danger

QuantiFERON Conjugate
(Conjugué QuantiFERON)

Contient de l'acide borique. Danger : peut nuire à la fertilité ou au fœtus. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. Se procurer les instructions avant utilisation. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Solution de blocage d'enzyme QuantiFERON)

Contient de l'acide sulfurique. Danger : provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut être corrosif aux métaux. Éliminer le contenu/ récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Solution de substrat enzymatique QuantiFERON)

Attention ! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée : consulter un médecin.

QuantiFERON Green Diluent
(Diluant vert QuantiFERON)

Contient du trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophényl)-4-(4-sulphophénylazo)pyrazole-3-carboxylate. Attention ! Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. En cas d'irritation/éruption cutanée : consulter un médecin. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON IFN-γ Standard
(Standard IFN-γ QuantiFERON)

Contient de l'acide borique. Danger : peut nuire à la fertilité ou au fœtus. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. Se procurer les instructions avant utilisation. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate
(Concentré de tampon de lavage 20x QuantiFERON)

Contient un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et de 2-méthyl-isothiazol-3(2H)-one (3:1). Attention ! Peut provoquer une réaction allergique cutanée. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

Conseils de prudence

Se procurer les instructions avant utilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX** : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. En cas d'irritation/éruption cutanée : consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

Autres informations

Fiches de données de sécurité : www.qiagen.com/safety

- Le non-respect de la *notice QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* peut entraîner des résultats erronés. Lire attentivement les instructions avant toute utilisation.
- Ne pas utiliser le kit si un flacon de réactif présente des signes d'endommagement ou de fuite avant son utilisation.

- Ne pas mélanger ou utiliser les bandelettes pour microplaque, le standard IFN-γ, le diluant vert ou le concentré conjugué 100x de différents lots de kit QFT-Plus. Les autres réactifs (concentré de tampon de lavage 20x, solution de substrat enzymatique et solution de blocage d'enzyme) peuvent être interchangés entre les kits si les réactifs ne sont pas périmés et si les détails du lot sont enregistrés. Éliminer les réactifs inutilisés et échantillons biologiques conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.
- Ne pas utiliser les tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus ou le kit ELISA après la date d'expiration.
- S'assurer que l'équipement de laboratoire a été calibré/validé pour utilisation.

Prélèvement et manipulation des échantillons

QFT-Plus utilise les tubes de prélèvement suivants :

1. QuantiFERON Nil Tubes (tubes de valeur zéro) (bouchon gris, anneau blanc)
2. QuantiFERON TB1 Tubes (bouchon vert, anneau blanc)
3. QuantiFERON TB2 Tubes (bouchon jaune, anneau blanc)
4. QuantiFERON Mitogen Tube (tube mitogène) (bouchon violet, anneau blanc)

Suivre les instructions ci-dessous pour les tubes d'héparine de lithium.

Les antigènes ont été séchés sur la paroi interne des tubes de prélèvement sanguin ; il est donc essentiel que le contenu des tubes soit soigneusement mélangé avec le sang. Les tubes QFT-Plus doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement.

Pour des résultats optimaux, respecter les procédures suivantes :

1. **Étiqueter correctement les tubes.**

   Veiller à ce que chaque tube (Nil, TB1, TB2 et Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré.

2. **Pour chaque patient, prélever 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans chaque tube de prélèvement sanguin QFT-Plus. Cette procédure doit être effectuée par un phlébotomiste expérimenté.**

   Remarque importante : les tubes doivent être à une température de 17 °C à 25 °C au moment du remplissage.

   Les tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus peuvent être utilisés à une altitude maximale de 810 mètres au-dessus du niveau de la mer.

   Comme le prélèvement sanguin pour des tubes d'1 ml est relativement lent, conserver le tube sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes une fois qu'il semble s'être rempli à la hauteur souhaitée. Cela permet de s'assurer que le bon volume est prélevé.

   Le marquage noir situé sur le côté des tubes indique l'intervalle de volume de remplissage autorisé situé entre 0,8 et 1,2 ml. Si le niveau de sang obtenu dans un tube dépasse les limites définies par le marquage, un nouvel échantillon sanguin doit être prélevé.

   Si une aiguille « papillon » est utilisée pour le prélèvement sanguin, un tube de purge doit être utilisé pour que la tubulure soit remplie de sang avant que les tubes QFT-Plus ne soient employés.

   Dans le cas d'une utilisation des tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus à une altitude supérieure à 810 mètres ou si le volume de sang aspiré est trop faible, il est possible de prélever le sang à l'aide d'une seringue avant d'en transférer immédiatement 1 ml dans chacun des 4 tubes. Pour des raisons de sécurité, la meilleure méthode consiste à retirer l'aiguille de la seringue en respectant les procédures de sécurité adéquates, à retirer les bouchons des 4 tubes QFT-Plus et à ajouter 1 ml de sang dans chacun des tubes (jusqu'au

centre du marquage noir situé sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons et mélanger comme décrit ci-dessous.

Le sang peut aussi être prélevé dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium comme anticoagulant avant d'être transféré vers les tubes QFT-Plus. **Utiliser uniquement l'héparine de lithium** comme anticoagulant car les autres anticoagulants interfèrent avec le test. Remplir un tube de prélèvement sanguin (volume minimal 5 ml) et mélanger doucement en retournant le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine. Le sang doit rester à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant d'être transféré dans les tubes QFT-Plus pour incubation, laquelle doit **impérativement** être lancée dans les 16 heures suivant le prélèvement sanguin. Si le sang a été prélevé dans un tube d'héparine de lithium, mélanger les échantillons de manière homogène en retournant doucement le tube avant de les répartir dans les tubes QFT-Plus. La répartition doit être réalisée dans des conditions d'asepsie, conformément aux procédures de sécurité adéquates, en retirant les bouchons des 4 tubes QFT-Plus et en ajoutant 1 ml de sang dans chacun des tubes (jusqu'au centre du marquage noir situé sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessous.

3. **Immédiatement après avoir rempli les tubes, les secouer dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est tapissée de sang. Cela dissoudra les antigènes sur les parois du tube.**

   Remarque importante : les tubes doivent être à une température de 17 °C à 25 °C au moment de l'agitation. Le secouement trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et peut entraîner des résultats aberrants.

4. **Après les avoir étiquetés, remplis et agités, transférer les tubes dans un incubateur à 37 °C ± 1 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Avant l'incubation, maintenir les tubes à température ambiante (22 °C ± 5 °C).**

Instructions d'utilisation

Étape 1 - Incubation du sang et prélèvement du plasma

Matériel fourni

- Tubes de prélèvement sanguin QFT-Plus (se reporter à la section 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir la section 3.

Procédure

1. **Si le sang n'est pas incubé immédiatement après avoir été prélevé, le nouveau mélange des tubes en les retournant 10 fois doit être effectué juste avant l'incubation.**
2. **Incuber les tubes DEBOUT à 37 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne nécessite pas de CO_2 ou d'humidification.**
3. **Après une incubation à 37 °C, les tubes de prélèvement sanguin peuvent rester entre 4 °C et 27 °C jusqu'à 3 jours avant d'être centrifugés.**
4. **Après l'incubation des tubes à 37 °C, le prélèvement du plasma est facilité par la centrifugation des tubes pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 x g FCR (*g*). Le module de gel séparera les cellules du plasma. Si ce n'est pas le cas, les tubes doivent être recentrifugés.**

   Il est possible de prélever le plasma sans centrifugation, mais il faudra faire particulièrement attention à le retirer sans perturber les cellules.
5. **Les échantillons de plasma doivent être prélevés uniquement à l'aide d'une pipette.**

   Remarque importante : après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

   Les échantillons de plasma peuvent être chargés directement depuis les tubes de prélèvement sanguin centrifugés vers la microplaque QFT-Plus ELISA, y compris lorsque des stations de travail ELISA automatiques sont utilisées.

   Les échantillons de plasma peuvent être stockés jusqu'à 28 jours entre 2 °C et 8 °C ou, s'ils sont prélevés, au-dessous de -20 °C pendant des périodes prolongées.

   Pour des échantillons de test corrects, prélever au moins 150 µl de plasma.

Étape 2 - IFN-γ ELISA

Matériel fourni

- Kit QFT-Plus ELISA (voir la section 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir la section 3.

Procédure

1. **Tous les échantillons de plasma et réactifs, sauf le concentré de conjugué 100x, doivent être amenés à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant d'être utilisés. Attendre au moins 60 minutes pour l'équilibration.**
2. **Retirer du cadre les bandelettes superflues, les resceller dans la poche en aluminium et les replacer au réfrigérateur pour stocker jusqu'à leur utilisation.**

   Prévoir au moins 1 bandelette pour les standards QFT-Plus et suffisamment de bandelettes pour le nombre de sujets testés (voir figure 2). Après utilisation, conserver le cadre et le couvercle pour un emploi ultérieur avec les bandelettes restantes.
3. **Reconstituer le standard IFN-γ avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète. La reconstitution du standard au volume indiqué produira une solution à une concentration de 8,0 UI/ml.**

   Remarque importante : le volume de reconstitution du standard du kit diffère selon les lots.

   Utiliser le standard du kit reconstitué pour produire une série de dilution à 1 pour 2 suivie d'une série de dilution à 1 pour 4 de l'IFN-γ dans le diluant vert (DV) (voir figure 1). Le S1 (standard 1) contient 4,0 UI/ml, le S2 (standard 2) contient 1,0 UI/ml, le S3 (standard 3) contient 0,25 UI/ml et le S4 (standard 4) contient 0 UI/ml (DV seul). Les standards doivent être testés au moins en duplicats. Préparer des dilutions fraîches du standard de kit pour chaque session ELISA.

Procédure recommandée pour les standards dupliqués
a. Étiqueter les 4 tubes « S1 », « S2 », « S3 », « S4 ».
b. Ajouter **150 µl** de DV à S1, S2, S3, S4.
c. Ajouter **150 µl** du standard du kit à S1 et mélanger soigneusement.
d. Transférer **50 µl** de S1 à S2 et mélanger soigneusement.
e. Transférer **50 µl** de S2 à S3 et mélanger soigneusement.
f. **Le DV seul** sert de standard zéro (S4).

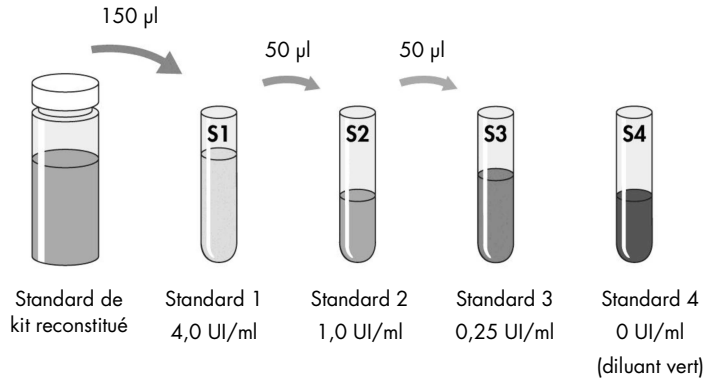


Figure 1. Préparation de la courbe de standard.

4. **Reconstituer le concentré de conjugué 100x lyophilisé avec 0,3 ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète du conjugué.**

   Le conjugué concentré prêt à l'emploi est préparé en diluant la quantité requise de concentré de conjugué 100x reconstitué dans le diluant vert (tableau 1 - Préparation du conjugué). Ramener tout concentré de conjugué 100x non utilisé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C immédiatement après emploi. Utiliser uniquement du diluant vert.

Tableau 1. Préparation du conjugué

Nombre de bandelettes	Volume du concentré de conjugué 100x	Volume de diluant vert
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. **Pour les échantillons de plasma prélevés dans les tubes de prélèvement sanguin puis stockés ou congelés, mélanger les échantillons avant de les ajouter au puits ELISA.**

   Remarque importante : si les échantillons de plasma sont ajoutés directement depuis les tubes QFT-Plus centrifugés, tout mélange du plasma doit être évité. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

6. **Ajouter 50 µl du conjugué concentré prêt à l'emploi fraîchement préparé dans les puits ELISA requis à l'aide d'une pipette multicanaux.**
7. **Ajouter 50 µl d'échantillons de plasma de test dans les puits appropriés à l'aide d'une pipette multicanaux (voir la configuration recommandée de microplaque, figure 2). Enfin, ajouter 50 µl de chacun des standards 1 à 4.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	*S1*	*S1*	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	*S2*	*S2*	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	*S3*	*S3*	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	*S4*	*S4*	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB2	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Figure 2. Configuration d'échantillons recommandée (22 tests par microplaque).

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4)
- 1 N (échantillon 1. Plasma de valeur zéro), 1 TB1 (échantillon 1. Plasma TB1), 1 TB2 (échantillon 1. Plasma TB2), 1 M (échantillon 1. Plasma mitogène)

8. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et mélanger le conjugué et les échantillons/ standards de plasma soigneusement en utilisant un agitateur de microplaque pendant 1 minute. Éviter les projections.**
9. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 120 ± 5 minutes.**

   Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.
10. **Au cours de l'incubation, diluer une mesure du concentré du tampon de lavage 20x avec 19 mesures d'eau déionisée ou distillée et mélanger soigneusement. Une quantité suffisante de concentré de tampon de lavage 20x est fournie pour préparer 2 litres de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi.**

    Laver les puits avec **400 µl** de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi pendant au moins 6 cycles. Un laveur de microplaque automatique est recommandé.

    Il est essentiel de procéder soigneusement au lavage avant d'exécuter le test. Veiller à ce que chaque puits soit **complètement rempli** de tampon de lavage pour chaque cycle de lavage. Une période de trempage d'au moins 5 secondes est recommandée entre chaque cycle.

    Un désinfectant de laboratoire standard doit être ajouté au réservoir d'effluent et les procédures établies pour la décontamination de matériel potentiellement infectieux doivent être suivies.
11. **Placer les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante à faible peluchage pour éliminer tout résidu de tampon de lavage. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique dans chaque puits, couvrir chaque microplaque avec un couvercle et mélanger soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque.**

12. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 30 minutes.**

    Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.

13. **Après les 30 minutes d'incubation, ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme à chaque puits et mélanger.**

    La solution de blocage d'enzyme doit être ajoutée aux puits dans le même ordre et à environ la même vitesse que pour le substrat à l'étape 11.

14. **Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits dans les 5 minutes de blocage de la réaction à l'aide d'un lecteur de microplaque équipé d'un filtre 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm. Les valeurs DO sont utilisées pour calculer les résultats.**

Calculs et interprétation du test

Le logiciel d'analyse QFT-Plus peut être utilisé pour analyser les données brutes et calculer les résultats. Il est disponible sur www.QuantiFERON.com. S'assurer que la version la plus récente du logiciel d'analyse QFT-Plus est utilisée.

Le logiciel effectue une évaluation de contrôle qualité du test, génère une courbe de standard et fournit un résultat de test pour chaque sujet, comme détaillé dans la section Interprétation des résultats.

En alternative à l'utilisation du logiciel d'analyse QFT-Plus, les résultats peuvent aussi être déterminés selon la méthode suivante.

Génération de la courbe de standard

(si le logiciel d'analyse QFT-Plus n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs DO moyennes des réplicats du standard du kit sur chaque microplaque.

Construire une courbe de standard $\log_{(e)}$-$\log_{(e)}$ en traçant le $\log_{(e)}$ de la DO moyenne (axe y) par rapport au $\log_{(e)}$ de la concentration IFN-γ des standards en UI/ml (axe x), en omettant le standard zéro dans ces calculs. Calculer la ligne de meilleur ajustement pour la courbe de standard par analyse de régression.

Utiliser la courbe de standard pour déterminer la concentration IFN-γ (UI/ml) de chacun des échantillons de plasma de test à l'aide de la valeur DO de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués à l'aide des packs logiciels disponibles avec les lecteurs de microplaque ainsi qu'avec les tableurs standards ou logiciels statistiques (comme Microsoft® Excel®). Il est recommandé d'utiliser ces logiciels pour calculer l'analyse de régression, le coefficient de variation (%CV) pour les standards ainsi que le coefficient de corrélation (*r*) de la courbe de standard.

Contrôle qualité du test

L'exactitude des résultats du test dépend de l'exactitude de la génération de la courbe de standard. Ainsi, il convient d'examiner les résultats dérivés des standards avant d'interpréter les résultats des échantillons du test.

Pour que le dosage ELISA soit valide :

- La valeur DO moyenne du standard 1 doit être ≥ 0,600.
- Le %CV des valeurs DO des réplicats du standard 1 et du standard 2 doit être ≤ 15 %.
- Les valeurs DO des réplicats pour les standards 3 et 4 ne doivent pas varier de plus de 0,040 unité de densité optique par rapport à leur moyenne.
- Le coefficient de corrélation (*r*) calculé à partir des valeurs d'absorbance moyennes des standards doit être ≥ 0,98.

Le logiciel d'analyse QFT-Plus calcule et rapporte ces paramètres de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, l'analyse est invalide et doit être répétée.

La valeur DO moyenne du standard zéro (diluant vert) doit être ≤ 0,150. Si la valeur DO moyenne est > 0,150, la procédure de lavage de microplaque doit être examinée.

Interprétation des résultats

Les résultats QFT-Plus sont interprétés selon les critères suivants :

Remarque importante : le diagnostic ou l'exclusion de la tuberculose et l'évaluation de la probabilité de LTBI exigent une combinaison de résultats épidémiologiques, historiques, médicaux et diagnostiques qui doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats QFT-Plus (tableau 2).

Tableau 2. Interprétation des résultats de QFT-Plus

<table>
<tr><th>Valeur zéro (UI/ml)</th><th>TB1 moins valeur zéro (UI/ml)</th><th>TB2 moins valeur zéro (UI/ml)</th><th>Mitogène moins valeur zéro (UI/ml)*</th><th>Résultat de QFT-Plus</th><th>Rapport/interprétation</th></tr>
<tr><td rowspan="4">≤ 8,0</td><td>≥ 0,35 et ≥ 25 % de la valeur zéro</td><td>Tous</td><td rowspan="2">Tous</td><td rowspan="2">Positif†</td><td rowspan="2">Infection à M. tuberculosis probable</td></tr>
<tr><td>Tous</td><td>≥ 0,35 et ≥ 25 % de la valeur zéro</td></tr>
<tr><td colspan="2">< 0,35
OU
≥ 0,35 et < 25% de la valeur zéro</td><td>≥ 0,5</td><td>Negatif</td><td>Infection à M. tuberculosis improbable</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">Tous</td><td>< 0,5</td><td rowspan="2">Indéterminé‡</td><td rowspan="2">Impossible de déter-miner la probabilité d'une infection par M. tuberculosis</td></tr>
<tr><td>> 8,0§</td><td colspan="2">Tous</td></tr>
</table>

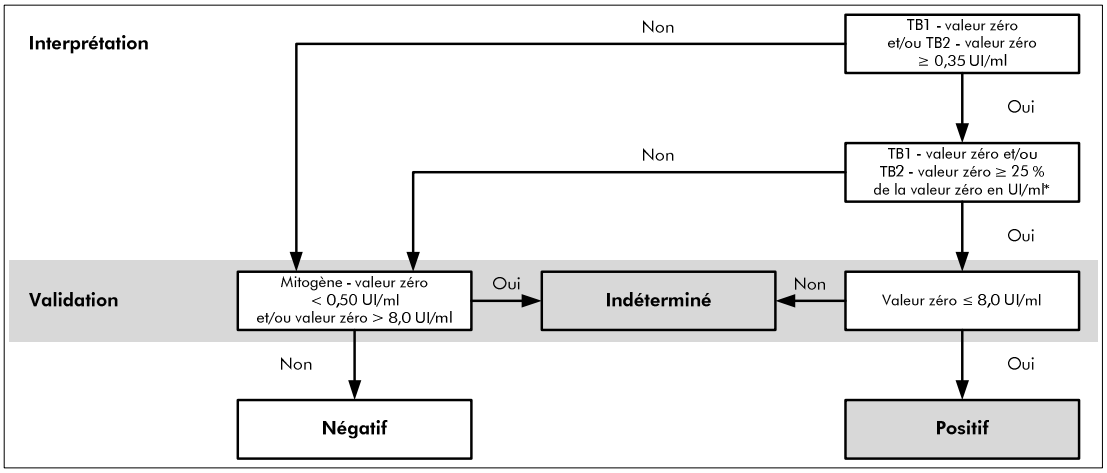
∗ Les réponses au contrôle positif mitogène (et occasionnellement au contrôle antigène TB) peuvent souvent être situées en dehors de la plage du lecteur de microplaques. Cela n'a pas d'impact sur les résultats du test.

† Si l'infection par *M. tuberculosis* n'est pas suspectée, les résultats initialement positifs peuvent être confirmés par un nouveau test des échantillons de plasma originaux en duplicats dans le dosage ELISA QFT-Plus. Si le test répété d'un ou de plusieurs réplicats est positif, l'individu doit être considéré comme positif au test.

‡ Voir la section « Dépannage » pour les causes possibles.

§ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des niveaux IFN-γ > 8,0 UI/ml pour la valeur zéro.

La magnitude du niveau IFN-γ mesuré ne peut pas être corrélée au stade ou au degré d'infection, au niveau de la réponse immunitaire ou à la probabilité de progression vers la maladie active. Une réponse positive à la tuberculose chez les personnes négatives au mitogène est rare, mais a déjà été observée chez les patients souffrant de la tuberculose. Cela indique que la réponse IFN-γ à l'antigène TB est supérieure à la réponse au mitogène, ce qui est possible car le niveau de mitogène ne stimule pas au maximum la production d'IFN-γ par les lymphocytes.



* Pour que TB1 moins valeur zéro ou TB2 moins valeur zéro soient valides, la quantité ≥ 25 % de la valeur zéro en UI/ml doit provenir du même tube que pour le résultat ≥ 0,35 UI/ml original.

Figure 3. Schéma d'interprétation QFT-Plus.

Limitations

Les résultats du test QFT-Plus doivent être utilisés en combinaison avec les antécédents épidémiologiques, le statut médical actuel et d'autres évaluations diagnostiques de chaque individu.

Les individus dont les valeurs zéro sont supérieures à 8,0 UI/ml sont considérés comme « indéterminés » car une réponse plus grande de 25 % aux antigènes TB peut se situer hors de la plage de mesure du test.

Les résultats non fiables ou indéterminés peuvent survenir dans les cas suivants :

- Déviations par rapport à la procédure décrite dans cette notice
- Niveaux excessifs d'IFN-γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles
- Plus de 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'incubation à 37 °C

Caractéristiques des performances

Études cliniques

Comme il n'existe pas de test standard définitif pour la LTBI, une estimation de la sensibilité et de la spécificité pour QFT-Plus ne peut pas être évaluée sur le plan pratique. La spécificité de QFT-Plus a été estimée par approximation en évaluant les taux de faux positifs chez les personnes présentant un faible risque (pas de facteur de risque connu) de l'infection tuberculeuse. La sensibilité a été estimée par approximation en évaluant des groupes de patients souffrant de la tuberculose active confirmée en culture.

Spécificité

Une étude d'évaluation de la spécificité de QFT-Plus a été réalisée chez 409 sujets. Les données démographiques et les facteurs de risque d'exposition à la tuberculose ont été déterminés à l'aide d'un sondage standardisé au moment du test.

Dans un résumé des résultats obtenus pour 2 groupes de patients présentant un faible risque (aucun facteur de risque connu) d'infection tuberculeuse, la spécificité globale de QFT-Plus était de 97,6 % (399/409) (tableaux 3 et 4).

Tableau 3. Résultats de l'étude de spécificité de QFT-Plus par site d'étude

Étude	Positif	Négatif	Indéterminé	Spécificité (IC 95 %)
Japon	4	203	0	98 % (95-100)
Australie	6	196	0	97 % (94-99)

Tableau 4. Résultats de l'étude de spécificité de QFT-Plus par tube d'antigène TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positif	5	10	10
Négatif	404	399	399
Indéterminé	0	0	0
Spécificité (IC 95 %)	98,8 % (97,2-99,6)	97,6 % (95,6-98,8)	97,6 % (95,6-98,8)

Sensibilité pour la tuberculose active

S'il n'existe pas de test de standard définitif pour la LTBI, la culture microbiologique de *M. tuberculosis* constitue un substitut adéquat, car les patients souffrant de la maladie sont par définition infectés. Les individus de 4 sites d'étude en Australie et au Japon, chez lesquels une tuberculose était suspectée puis chez lesquels on a confirmé l'infection par *M. tuberculosis* par culture, ont été testés pour évaluer la sensibilité de QFT-Plus (tableaux 5 et 6). Les patients avaient reçu moins de 14 jours de traitement avant le prélèvement sanguin pour le test QFT-Plus.

Dans un résumé des résultats obtenus pour les 4 groupes de patients positifs à la culture *M. tuberculosis*, la sensibilité globale de QFT-Plus pour la tuberculose active était de 95,3 % (164/172). Dans les 4 groupes, 159 patients étaient positifs pour les deux tubes, TB1 et TB2, 1 patient était positif pour le TB1 uniquement et 4 patients étaient positifs pour le TB2 uniquement. Un total de 1,1 % (2/174) des résultats étaient indéterminés. Le résultat TB2 a correctement identifié 1 patient confirmé en culture dont le résultat TB1 seul aurait été indéterminé (mitogène faible) (voir tableaux 5 et 6).

Tableau 5. Résultats de l'étude de sensibilité de QFT-Plus par site d'étude

Sites d'étude	Positif	Négatif	Indéterminé	Sensibilité QFT-Plus* (IC 95 %)
Site japonais 1	36	7	0	84 % (69-93)
Site japonais 2	53	1	2	98 % (90-100)
Site japonais 3	54	0	0	100 % (93-100)
Site australien	21	0	0	100 % (84-100)

* La sensibilité repose sur le nombre total de tests valides et exclut les résultats indéterminés.

Tableau 6. Résultats de l'étude de sensibilité de QFT-Plus par tube d'antigène TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positif	160	163	164
Négatif	11	9	8
Indéterminé	3	2	2
Sensibilité† (IC 95 %)	93,6 % (88,8-96,7)	94,8 % (90,3-97,6)	95,3 % (90,9-97,9)

† La sensibilité repose sur le nombre total de tests valides et exclut les résultats indéterminés.

Distributions de réponses observées, stratifiées selon le risque

Une série de réponses IFN-γ à TB1, TB2 et aux tubes de contrôle a été observée dans le cadre d'essais cliniques et stratifiée selon le risque d'infection *M. tuberculosis* (figures 4-7). Le groupe à risques mixtes est constitué de sujets représentatifs d'une population générale de test et inclut des sujets avec ou sans facteurs de risque d'exposition à la tuberculose et chez lesquels la tuberculose active est improbable (c'est-à-dire avec LTBI).

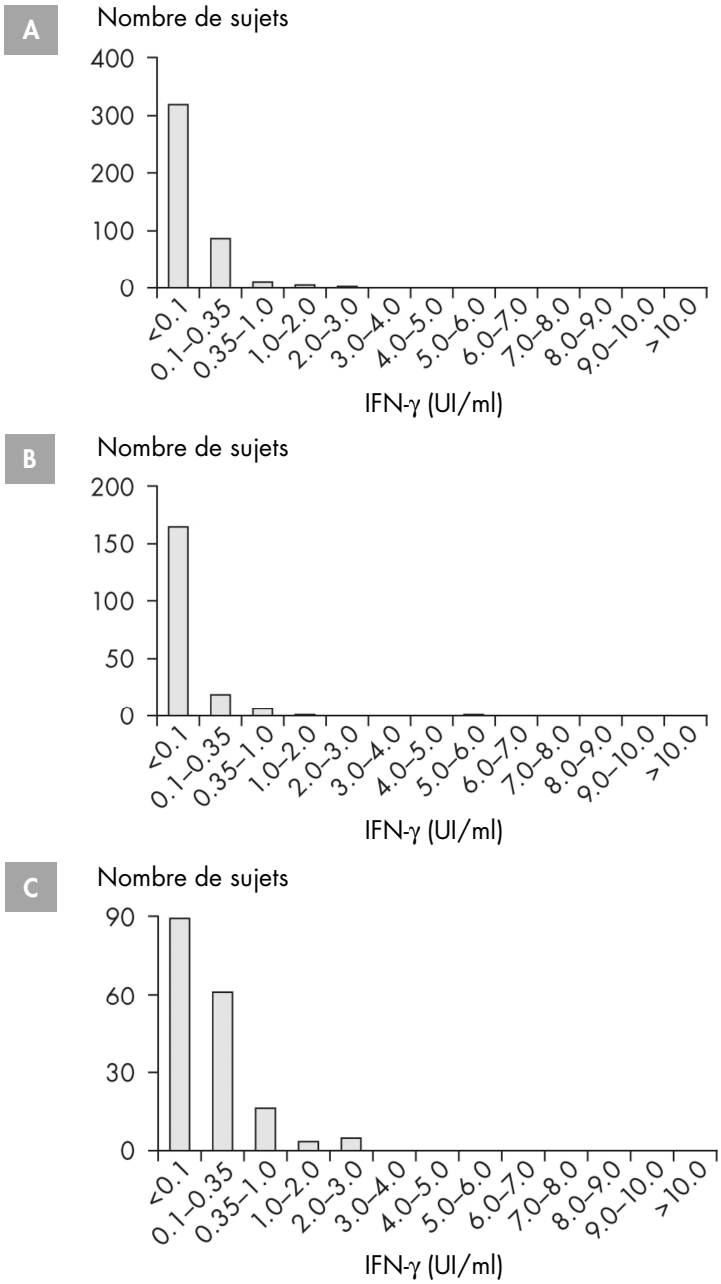


Figure 4. Distribution des valeurs zéro. A. Distribution des valeurs zéro dans une population à faible risque (n=409). B. Distribution des valeurs zéro dans une population à risques mixtes (n=194). C. Distribution des valeurs zéro dans une population présentant l'infection *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=174).

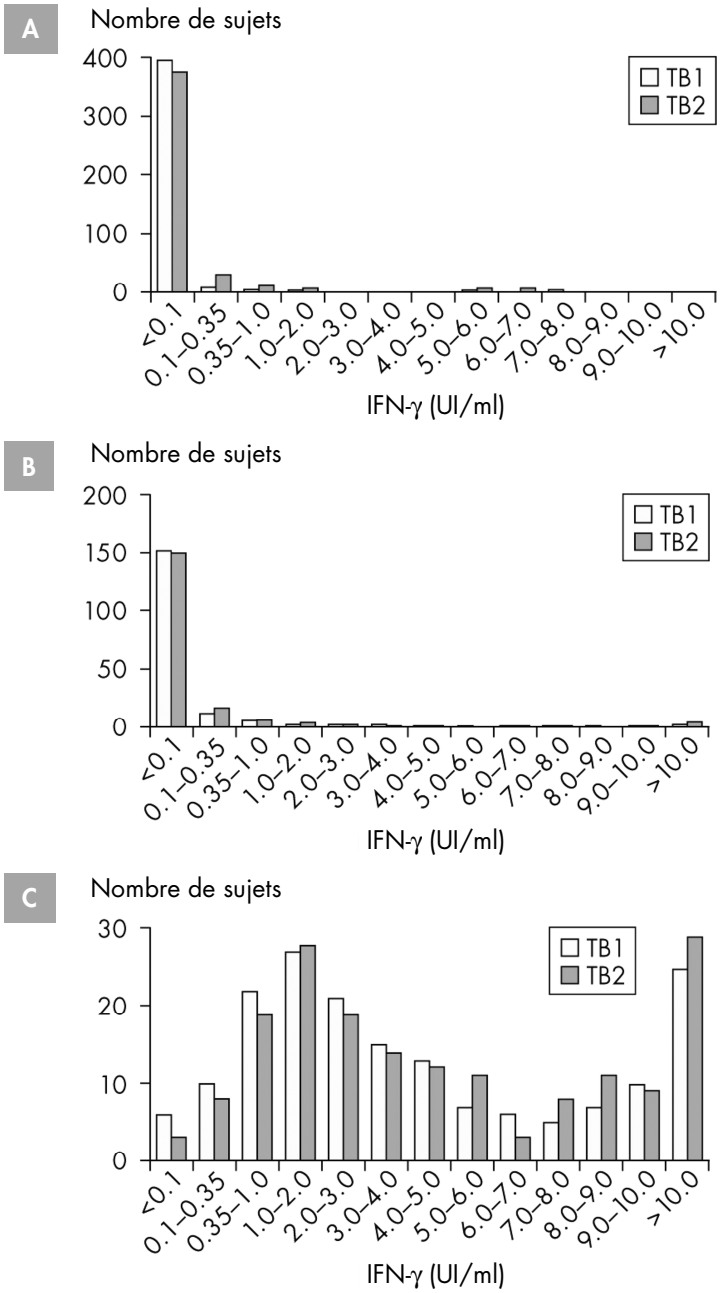


Figure 5. Distribution de TB1 et TB2 (valeur zéro soustraite). A. Distribution des valeurs TB1 et TB2 (valeur zéro soustraite) dans une population à faible risque (n=409). B. Distribution des valeurs TB1 et TB2 (valeur zéro soustraite) dans une population à risques mixtes (n=194). C. Distribution des valeurs TB1 et TB2 (valeur zéro soustraite) dans une population présentant l'infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=174).

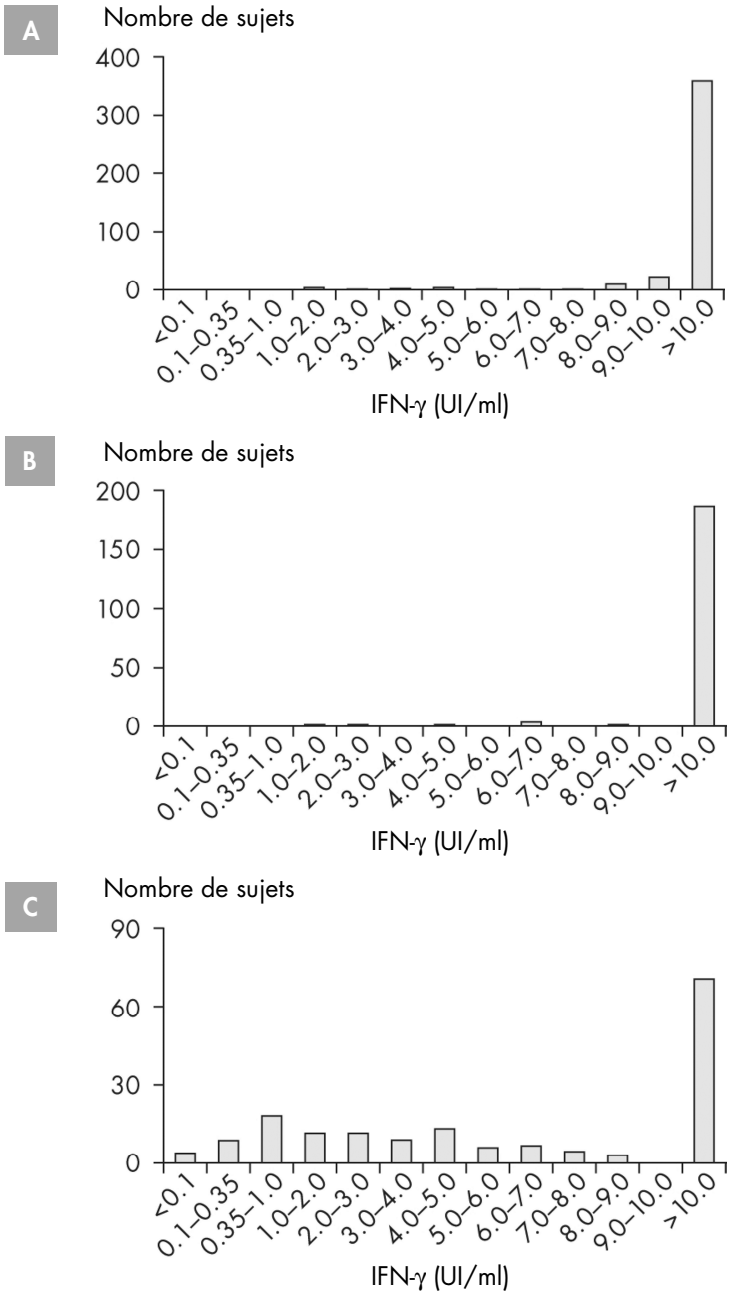


Figure 6. Distribution de mitogène (valeur zéro soustraite). A. Distribution de mitogène (valeur zéro soustraite) dans une population à faible risque (n=409). B. Distribution de mitogène (valeur zéro soustraite) dans une population à risques mixtes (n=194). C. Distribution de mitogène (valeur zéro soustraite) dans une population présentant l'infection *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=169).

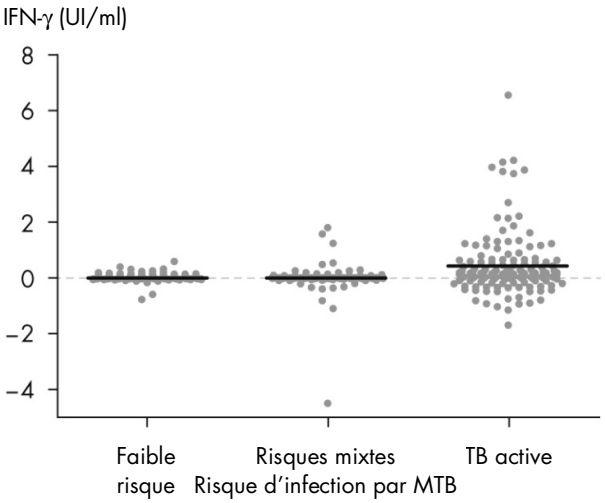


Figure 7. Différence observée entre les valeurs TB1 et TB2 (valeur zéro soustraite), stratifiée selon le risque. Population à faible risque (n=409), population à risques mixtes (n=189) et population présentant l'infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=141). Les valeurs TB1 ont été soustraites des valeurs TB2. Les sujets présentant des valeurs TB1 ou TB2 > 10,0 UI/ml ont été exclus car ils se situent en dehors de l'intervalle de linéarité du test.

Caractéristiques des performances du test

Il a été démontré que le test QFT-Plus ELISA est linéaire. Pour ce faire, 5 réplicats de 11 pools de plasma de concentrations IFN-γ connues ont été placés de manière aléatoire sur la micro-plaque ELISA. La droite de régression linéaire présente une pente de 1,002 ± 0,011 et un coefficient de corrélation de 0,99 (figure 8).

La limite de détection du test QFT-Plus ELISA est de 0,05 UI/ml et il n'existe aucune preuve d'un effet crochet à haute dose (prozone) avec les concentrations d'IFN-γ jusqu'à 10 000 UI/ml.

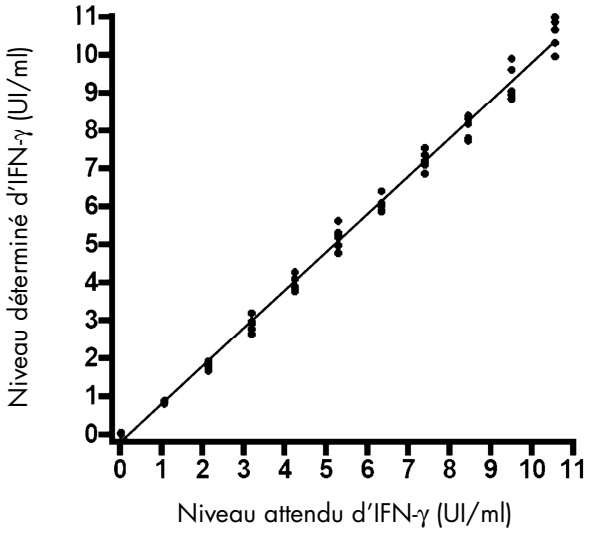


Figure 8. Profil de linéarité du test QFT-Plus ELISA.

L'imprécision intratest et intertest (% CV) du test QFT-Plus ELISA a été estimée. Pour ce faire, 3 opérateurs différents ont testé 20 échantillons de plasma présentant différentes concentrations IFN-γ dans des réplicats de 3, dans 3 laboratoires différents et pendant 3 jours non consécutifs. Chaque échantillon a ainsi été testé 27 fois dans le cadre de 9 analyses indépendantes. L'un des échantillons était un contrôle zéro présentant une concentration IFN-γ calculée de 0,08 UI/ml (IC 95 % : 0,07-0,09). Sur les 19 échantillons de plasma restants, les concentrations étaient comprises entre 0,33 (IC 95 % : 0,31-0,34) et 7,7 UI/ml (IC 95 % : 7,48-7,92).

L'imprécision intratest (au sein d'une même analyse) a été estimée au moyen du calcul de la moyenne des coefficients de variation (%CV) de chaque plasma de test contenant de l'IFN-γ issu de chaque analyse de microplaque (n=9). L'imprécision est comprise entre 4,1 et 9,1 % CV. La covariance intratest moyenne (IC°±95 %) était de 6,6 % ± 0,6 %. La moyenne du plasma IFN-γ zéro était de 14,1 % CV.

L'imprécision totale ou intertest a été déterminée par comparaison des 27 concentrations calculées d'IFN-γ pour chaque plasma de test. L'imprécision intertest était comprise entre 6,6 et 12,3 % CV. Le %CV moyen global (IC°±95 %) était de 8,7 % ± 0,7 %. Le plasma IFN-γ zéro présentait un CV de 26,1 %. Ce niveau de variation est prévisible car la concentration calculée d'IFN-γ est faible et la variation pour une estimation de concentration faible est supérieure à celle pour des concentrations plus élevées.

La reproductibilité du test QFT-Plus a été déterminée à l'aide d'échantillons sanguins de 102 sujets présentant des facteurs de risques mixtes d'infection à *M. tuberculosis*. Trois opérateurs différents et trois conditions de laboratoires différentes ont été évalués.

3 déterminations diagnostiques par sujet ont été réalisées, soit un total de 306 déterminations diagnostiques pour l'ensemble des sujets. La reproductibilité diagnostique globale était de 99 % (IC 95 % : 97,2-99,7), le résultat diagnostique étant concordant pour 303 déterminations sur 306. Les résultats de 3 sujets proches de la valeur seuil étaient responsables de la variation totale.

Diagnostic de la LTBI

Un certain nombre d'études ont été publiées pour démontrer les performances du QFT, le précurseur du QFT-Plus, dans plusieurs populations présentant un risque d'infection par MTB. Les principaux résultats de certaines études choisies sont indiqués dans le tableau 7.

Tableau 7. Études publiées sélectionnées concernant le QFT

Population condition	Conclusions et résultats	Nombre total d'études publiées
Pédiatrie	Performances prouvées chez les enfants, y compris les enfants de moins de 5 ans (45-46), avec précision supérieure à celle du test IGRA reposant sur le test ELISpot (8). La plus importante étude à ce jour comparant le QFT et le TST chez des enfants du Vietnam, des Philippines et du Mexique préconise l'utilisation du QFT plutôt que du TST pour tester la LTBI chez les enfants nés à l'étranger (46). Une étude de contacts limités révèle une meilleure valeur prédictive qu'avec le TST chez les enfants (47) et un risque 8 fois supérieur de progression vers la tuberculose sur une période de deux ans parmi les sujets convertis au QFT par rapport aux non-convertis (48). La discordance « négatif au QFT/positif au TST » est élevée chez les enfants vaccinés par le BCG (46, 49), mais aucun impact sur la réponse au mitogène n'a été constaté chez les enfants de moins de 5 ans (49), tandis que le taux de résultats indéterminés était faible lors du dépistage de routine des enfants immigrés (46).	152
Grossesse	Dans une région à faible charge, les performances du QFT présentent la même qualité à chaque trimestre de grossesse, les résultats étant comparables à ceux de femmes non enceintes. La spécificité du QFT est largement supérieure et sa sensibilité au moins égale. En outre, le QFT pourrait mieux prédire la progression de la maladie que le TST (50). Dans une région à charge élevée, le QFT a été plus stable tout au long de la grossesse et a fourni une approximation plus précise de la prévalence de la LTBI de fond par rapport au TST. Toutefois, les auteurs ont conclu que la grossesse affectait à la fois le QFT et le TST (51).	6
VIH/SIDA	Les tests IGRA et TST sont tous deux affectés par l'infection au VIH. Plusieurs données probantes indiquent que les résultats doivent être interprétés avec prudence chez les sujets présentant des taux de $CD4^+ < 200$ (52). Il a été démontré que le QFT est moins affecté que le TST et l'IGRA reposant sur ELISpot (53-55). Le test IGRA ne nécessite qu'une seule visite. Il n'est donc pas touché par le problème de faible taux de présence chez cette population, contrairement au TCT (53).	101

Population/ condition	Conclusions et résultats	Nombre total d'études publiées
Traitements immono-suppresseurs	Le QFT est moins affecté par les traitements immonosuppresseurs que le TST et présente une meilleure corrélation avec les facteurs de risque de la TB (23, 27). Le QFT présente une sensibilité élevée chez les patients souffrant d'une maladie rhumatismale (23, 56, 57), ainsi qu'une spécificité supérieure à celle du TST, ce qui réduit le risque de faux positifs et de traitements inutiles qui auraient lieu avec le TST (23, 57, 58).	112
Professionnels de santé	Il a été démontré que ce test présente une spécificité supérieure à celle du TST ainsi qu'un risque de faux positifs inférieur, et qu'il est plus économique que le TST (59-62). La variabilité à proximité du seuil est un résultat attendu avec les tests en série, en raison du seuil dichotomique et de la variabilité inhérente d'un test biologique (63). Des études ont indiqué des taux de conversion/réversion supérieurs à ceux du TST lors de tests en série chez des professionnels de la santé à faible risque (64, 65). Le CDC américain reconnaît que le critère souple utilisé pour définir la conversion IGRA peut entraîner plus de conversions que celles observées avec les critères quantitatifs plus stricts du TST. En outre, il a été démontré que les stratégies de réanalyse sont plus efficaces dans la gestion du phénomène de conversion/réversion (65-68).	111
Contacts de TB	VPP et VPN supérieures à celles du TST (47) ; avantage de la visite unique pour les sujets risquant de ne pas se représenter (63) ; meilleure corrélation à l'exposition (69), particulièrement chez les personnes vaccinées par le BCG et les populations provenant de pays pratiquant la vaccination par le BCG (70, 71).	89
Transplantation	Il a été démontré que le test est aussi efficace que le TST, mais moins affecté que ne l'est le TST par une maladie organique en phase terminale (22).	23

Population/ condition	Conclusions et résultats	Nombre total d'études publiées
Diabète	Il existe diverses données probantes contradictoires issues d'un faible nombre de publications portant sur un faible nombre de sujets. Selon une étude d'une zone à faible charge, la sensibilité du QFT n'est pas compromise par le diabète chez les patients atteints de TB (72). Une étude menée en Tanzanie, une région à charge élevée, suggérant un impact négatif du diabète sur la production d'IFN-γ, n'a pas pris en compte les facteurs de confusion, tels que les infections au VIH et aux helminthes (73). Dans des études menées au Vietnam, 838 patients se déclarant diabétiques et chez lesquels la TB était suspectée en raison de radiographies du thorax anormales ou chez lesquels la TB active était confirmée par culture (n=128), la positivité au QFT était supérieure ou égale aux seuils TST de 10 et 15 mm (74).	9
Maladie rénale en phase terminale	Les résultats positifs au QFT présentent une meilleure corrélation avec les facteurs de risque pour la TB que le TST, et sont moins associés avec le BCG (75).	45
Migrants	Des études démontrent que le QFT n'est pas affecté par le BCG et par l'âge, contrairement au TST (74). Il a été démontré que le QFT représente la méthode la plus économique (76). Dans les régions à faible charge, la majorité des cas de TB correspondait à des personnes nées à l'étranger et à des réactivations de la TB latente après arrivée (77). La plus importante étude à ce jour comparant le QFT et le TST chez des enfants immigrés préconise l'utilisation du QFT plutôt que du TST pour tester l'infection TB latente chez les enfants nés à l'étranger (46).	29

Informations techniques

Résultats indéterminés

Les résultats indéterminés sont peu fréquents et peuvent être liés au statut immunologique de l'individu testé, mais aussi à un certain nombre de facteurs techniques en cas de non-respect des instructions d'utilisation ci-dessus.

Si des problèmes techniques sont suspectés avec le stockage des réactifs, le prélèvement sanguin ou la manipulation des échantillons sanguins, répéter tout le test QFT-Plus avec un nouvel échantillon sanguin. Il est possible de répéter le test ELISA de plasmas stimulés si un lavage insuffisant ou une autre déviation de procédure avec le test ELISA sont suspectés. Les résultats indéterminés dus à des valeurs mitogènes faibles ou à des valeurs zéro élevées ne changeront pas si le test est répété, sauf en cas d'erreur avec le test ELISA. Les résultats indéterminés doivent être reportés tels quels. Les médecins peuvent choisir de prélever à nouveau un échantillon ou d'effectuer d'autres procédures s'ils le jugent nécessaire.

Échantillons de plasma coagulé

Si des caillots de fibrine apparaissent avec le stockage à long terme des échantillons de plasma, centrifuger les échantillons pour sédimenter la matière coagulée et faciliter le pipetage du plasma.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, voir également les informations techniques fournies sur : www.QuantiFERON.com. Pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture.

Dépannage ELISA

Développement de couleur non spécifique

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Contamination croisée des puits ELISA	Prendre garde lors du pipetage et du mélange des échantillons pour réduire les risques.
c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100x sont utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat enzymatique contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.
e) Mélange du plasma dans les tubes QFT-Plus avant le prélèvement	Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

Lectures de faible densité optique pour les standards

Cause possible	Solution
a) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard de kit sont préparées correctement conformément à la présente notice.
b) Erreur de pipetage	S'assurer que les pipettes sont calibrées et utilisées conformément aux instructions du fabricant.
c) Température d'incubation trop faible	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C).
d) Période d'incubation trop courte	L'incubation de la microplaque avec le conjugué, les standards et les échantillons doit être effectuée pendant 120 ± 5 minutes. La solution de substrat enzymatique est incubée sur la microplaque pendant 30 minutes.
e) Mauvais filtre de lecteur de microplaque utilisé	La microplaque doit être lue à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.

f) Les réactifs sont trop froids	Tous les réactifs, à l'exception du concentré de conjugué 100x, doivent être amenés à température ambiante avant le début du test, ce qui prend environ une heure.
g) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100x sont utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution.

Bruit de fond élevé

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Température d'incubation trop élevée	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C).
c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100x sont utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat enzymatique contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.

Courbe de standard non linéaire et variabilité des duplicats

Cause possible	Solution
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard sont préparées correctement conformément à la présente notice.
c) Mélange insuffisant	Mélanger soigneusement les réactifs par inversion ou en les vortexant doucement avant de les ajouter à la microplaque.
d) Technique de pipetage incohérente ou interruption pendant la mise en place du test	L'ajout des échantillons et des standards doit être effectué de manière continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant le début du test.

Les informations produit et les guides techniques sont disponibles gratuitement auprès de QIAGEN, via votre distributeur ou sur le site www.QuantiFERON.com.

Références

Une liste complète de références QFT-Plus et QFT est disponible sur Gnowee, la bibliothèque de référence QuantiFERON, sur le site www.gnowee.net.

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. Int. J. Infect. Dis. **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. Eur. Respir. J. **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27**,907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. Respir. Res. **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. PLoS ONE **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. Clin. Infect. Dis. **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. Chest **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN-γ assay for the development of active TB disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. Respir. Res. **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. J. Infect. **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. PLoS Med. **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. Respirology **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. J. Infect. **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. Med. Microbiol. Immunol. **198**, 33.

17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA **293**, 2756.

18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **12**, 1146.

19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. Swiss. Med. Wkly. **138**, 267.

20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **175**, 737.

21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. Am. J. Ophthalmol. **146**, 761.

22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. Am. J. Transplant. **7**, 2797.

23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. Ann. Rheum. Dis. **67**, 84.

24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **12**, 513.

25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. Emerging Infect. Dis. **12**, 1383.

26. Pai, M. et al. (2005) Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. JAMA **293**, 2746.

27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. J Rheumatol. **35**, 776.

28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. Eur. Respir. J. **32**, 524.

29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? Expert Rev. Anti Infect. Ther. **3**, 981.

30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol. **103**, 2799.

31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. Clin. Biochem. **40**, 913.

32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **29**, 681.

33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. Immunology **87**, 339.

34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human microphages. Eur. J. Immunol. **33**, 3293.

35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science **282**, 121.

36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**, 270.

37. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. J. Immunol. **166**, 439.

38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathol. **3**, 1240.

39. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J. Immunol. **187**, 2222.

40. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. **43**, 1568.

41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **75**, 277.

42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.

43. Ongaya, A. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis **93**, S60.

44. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **185**, 206.

45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon-γ release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. Clin. Pediatr.

46. Howley, M.M. et al. (2014) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. Ped. Infect. Dis.

47. Diel, R., Loddenkember, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon-γ release assay for developing active tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **183**, 88.

48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **186**, 1051.

49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). Allergy Asthma Proc. **33**, 217.

50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. Obstet. Gynecol. **119**, 1088.

51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. PLoS ONE **9**, e92308.

52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. Eur. Infect. Dis. **4**, 23.

53. Cheallaigh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. PLoS ONE **8**, e53330.

54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. BMC Infect. Dis. **12**, 169.

55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon-γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. J. Infect. **66**, 376.

56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon-γ release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum. **64**, 2068.

57. Garcovich, S. et al. (2011) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. J. Eur. Acad. Dermatol. Ven.

58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. Clin. Rheumatol. **30**, 505.

59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **30**, 215.

60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. Arch. Intern. Med. **169**, 179.

61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon-γ release assay in healthcare workers. Int. Arch. Occup. Environ. Health **81**, 295.

62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. BMC Health Serv. Res. **11**, 247.

63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection — United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. **59 (RR-5)**, 1.

64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon-γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **189**, 77.

65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. Chest **142**, 55.

66. Thanassi, W., Noda, A., Hernandez, B., Newell, J., Terpeluk, P., Marder, D. and Yesavage, J.A. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. Pulm. Med. doi: 10.1155/2012/291294. Epub.

67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Hatlh Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. J. Occup. Environ. Med. **55**, 985.

68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T., Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN-γ release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. Expert Rev. Anti Infect. Ther. **11**, 37.

69. Arend S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. Amer. J. Respir. Crit. Care Med. **175**, 618.

70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesseling, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **15**, 1018.

71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **15**, 1614.

72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon-γ release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **15**, 179.

73. Faurholt-Jespen, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. Scand. J. Infect. Dis. **46**, 384.

74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. PLoS ONE **8**, e82727.

75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. Amer. J. Kidney Dis. **61**, 33.

76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. Thorax. **68**, 230.

77. WHO Global Tuberculosis Report, 2013. http://www/who.int.iris/handle/10665/91355 Consulté le 14 juillet 2013.

Symboles

	Suffisant pour 2 x 96 préparations d'échantillons
	Fabricant autorisé
	Symbole de la certification CE-IVD
	Utilisation prévue pour le diagnostic *in vitro*
	Code de lot
	Numéro de référence
	Code article international (GTIN)
	À utiliser avant le
	Limite de température
	Consulter les instructions d'utilisation
	Ne pas réutiliser
	Conserver à l'abri des rayons du soleil

Coordonnées

Pour une assistance technique ou pour de plus amples informations, appeler le numéro gratuit 00800-22-44-6000, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/contact ou contacter l'un des départements d'assistance technique (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Résumé de la procédure du test

Étape 1 - Incubation du sang

1. Prélever le sang du patient dans les tubes de prélèvement sanguin et les mélanger en les secouant dix (10) fois suffisamment fort pour que toute la paroi interne du tube soit tapissée de sang. Cela dissoudra les antigènes sur les parois du tube.

2. Incuber les tubes debout à 37 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures.

3. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 x *g* FCR (*g*) pour séparer le plasma et les globules rouges.

4. Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

Étape 2 - IFN-γ ELISA

1. Amener les composants ELISA, à l'exception du concentré de conjugué 100x, à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant au moins 60 minutes.

2. Reconstituer le standard du kit à 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer quatre (4) dilutions de standard.

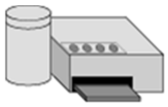
3. Reconstituer le concentré de conjugué 100x lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.

4. Préparer le conjugué concentré prêt à l'emploi dans le diluant vert et ajouter 50 µl dans tous les puits.

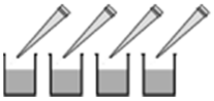
5. Ajouter 50 µl d'échantillons de plasma test et 50 µl de standards dans les puits correspondants. Mélanger avec l'agitateur.

6. Incuber pendant 120 ± 5 minutes à température ambiante.

7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage.

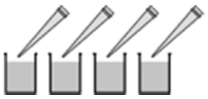


8. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

10. Ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



11. Lire les résultats à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.

12. Analyser les résultats.

Cette page est intentionnellement laissée vierge.

Cette page est intentionnellement laissée vierge.

Marques déposées : QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Groupe QIAGEN) ; Microsoft®, Excel® (Microsoft) ; ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Accord de licence limité pour QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à cette notice et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit et cette notice.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus, sauf mention contraire de QIAGEN.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

© 2014-2015 QIAGEN, tous droits réservés.

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific | techservice-ap@qiagen.com

Europe | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) | techservice-latam@qiagen.com